

羊毛汚染菌代謝産物としてのシトリニン

藤 木 清 子

(昭和 46 年 1 月 30 日受理)

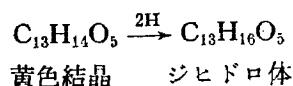
Citrinin, a Metabolite of *Penicillium* sp. Isolated from Wool Contaminated with Fungi.

KIYOKO FUJIKI

A yellow pigment was obtained from the acidified culture filtrates of *Penicillium* sp. which was isolated from wool contaminated with fungi. By extracting the pigment with hot toluene the yellow crystals having a melting point of 165.5–167.5°C (dec.) (1), were formed and the molecular formula of (1) was at first considered to be a dibasic acid of constitution $C_{21}H_{22}O_8$, but was postulated for $C_{13}H_{14}O_5$ by the elementary analyses, the NMR spectra and the Mass spectra of (1) and its derivatives. The structure of (1) was identified as citrinin, $C_{13}H_{14}O_5$, by comparing its IR spectrum with that of citrinin isolated from *Penicillium citrinum* and by its failure to depress the melting point of the authentic sample.

1. 緒 言

羊毛製品を倉庫などに長期間保管していると、かびが生えて黄色に汚染されることがある。この汚染羊毛から分離した *Penicillium* sp. (東京家政大学教授神野節子農博が分離) をポテト培地で 28°C, 約 2 週間培養し, ロカによって菌体と分けた培養液に 6 規定塩酸を加え, 生じた黒黄色粉末を熱トルエンで抽出し, 抽出された黄色色素をメタノールで再結晶して mp 165.5–167.5°C の黄色板状結晶を得た。この黄色結晶の分子量は, 滴定法により測定すると 404 であったので元素分析値から分子式 $C_{21}H_{22}O_8$ (分子量 402) を推定し, アダムスの酸化白金による接触還元体 $C_{21}H_{26}O_8$ の元素分析値もこの式を支持するかに見えた。しかし核磁気共鳴スペクトルは黄色結晶の水素数 14 ケ, その還元体が 16 ケであることを示し, 質量スペクトルは黄色結晶では 250 以上にピークを示さず, (M-44) に相当する 206 に最大ピークが認められ, 還元体においても 208 に最大ピークを示すところから, 黄色結晶は分子式 $C_{13}H_{14}O_5$ (分子量 250) のモノカルボン酸であり, したがって還元体は $C_{13}H_{16}O_5$ のジヒドロ体であることが判明した。これら 2 つの分子式はいずれもその炭水素元素分析値をよく満足せしめる。



2. 結果と考察

定性反応から (表 1) 黄色結晶は, エノール性水酸基それも三塩化チタンによる呈色反応¹⁾ お

表 1 定 性 反 応

	黄 色 結 晶	ジヒドロ体
conc. H_2SO_4	薄い黄色を呈して溶け青い螢光を放つ ²⁾ 。	橙黄色を呈して溶け、次第に黒赤色になる。
0.1 N NaOH	濃黄色を呈し溶ける。	溶ける。
5 % NaHCO_3	二酸化炭素を発生して徐々に溶けついで褪色する	溶ける。10% NaHCO_3 では激しく二酸化炭素を発生する。
1 % FeCl_3 alc. solution	血赤色	藍色
$\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$	30 秒沸騰させると少量の水銀が沈殿する。	白色沈殿を生じ、沸騰させると直ちに多量の水銀が沈殿する。
TiCl_3 CH_3OH soln.	濃暗緑色	真赤色

表 2 核磁気共鳴スペクトル
(60 Mc/sec. TMS 内部標準)

黄色結晶 (CDCl_3)					ジヒドロ体 (CHCl_3)				
τ		H	J	帰 属	τ		H	J	帰 属
8.75	d	3	7.5	4 位の CH_3 の H	8.77	s	3		4 位の CH_3 の H
8.62	d	3	7.0	3 位の CH_3 の H	8.66	s	3		3 位の CH_3 の H
7.97	s	3		5 位の CH_3 の H	7.90	s	3		5 位の CH_3 の H
7.00	q	1	7.5	4 位の H	7.27	q	1	7.5	4 位の H
5.17	q	1	7.0	3 位の H	5.89	q	1	7.0	3 位の H
1.73	s	1		1 位の H	5.23	s	2		1 位の 2H
-5.14	s	1		8 位の OH の H と	-0.83	br.	3		6 位と 8 位の OH
-5.92	s	1		7 位の COOH の H					の H と 7 位の COOH の H

表 3 紫外線吸収スペクトル
(エタノール溶液)

黄 色 結 晶				
$\lambda_{\text{max}, m\mu}$	218	253	321	400
ϵ	23600	8800	5700	640 (infl.)
黄色結晶メチルエステル				
$\lambda_{\text{max}, m\mu}$	220	260	332	
ϵ	1790	10200	3200	
ジ ヒ ド ロ 体				
$\lambda_{\text{max}, m\mu}$	219	251	322	
ϵ	22000	4600	3200	

よび濃硫酸試験²⁾ から 1-ケト-3-エノールグループをもつベンゾ- γ -ピラン系の強酸であることが推測され、事実酸解離定数³⁾ は分光光度法により測定した結果、50% エタノール水溶液で 2.33

であった。また NMR スペクトルから (表 2) 3つのメチル基が存在し、そのうち高磁場側の2つは doublet を示すことから、それぞれのメチル基が結合しているその炭素に水素原子が各1つずつつきメチル基と couple していることがわかる。残りのメチル基はその τ 値から $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-$, $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{C}-$ 型結合のいずれかをしていると予想される。赤外吸収スペクトルから (図 1) 水酸基とカルボキシル基が存在し、両者の水素は NMR で τ -5.14 と -5.92 に singlet に出、これは隣接した両基が強い分子内水素結合を形成しているとしてその低磁性が説明される。

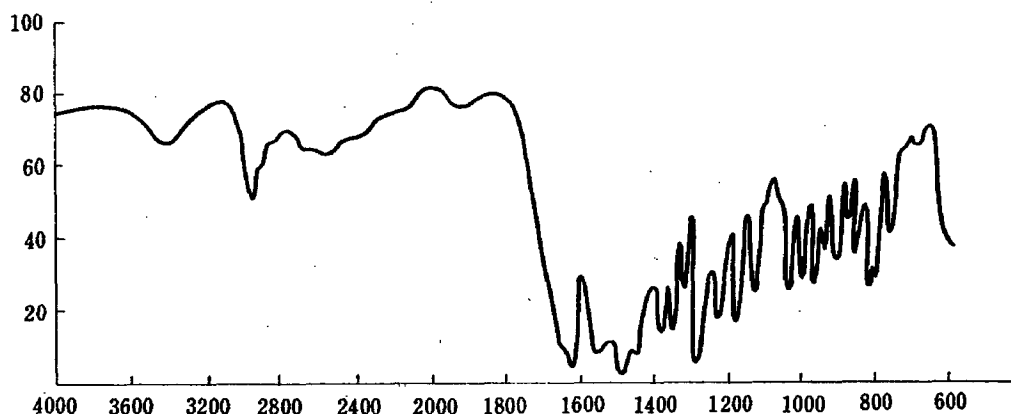
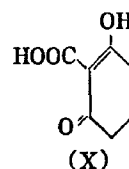


図 1 黄色結晶の赤外線吸収スペクトル (KBr 法)

ベンゾ- γ -ピラン環を仮定すれば1つのカルボキシル基と3つのメチル基で炭素数合計は13になり、したがって側鎖はなくメチル基はすべて環に直結していることになる。故に singlet メチル基は $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}=\text{CH}_2$ に相当する筈である。また5つの酸素のうち、カルボキシル基、水酸基およびピラン酸素以外の残る1つは、赤外スペクトルからカルボニルであるが同様の理由によりこれも環ケトンでなければならない。ジヒドロ還元体においてはこのカルボニルが水酸基に還元され IR や NMR に示されている。そしてジヒドロ体の酸解離定数は分光光度法によって測定した結果、50% エタノール水溶液で 1.5 という 2,6-ジヒドロキシ安息香酸の 1.3⁴⁾ もしくは 1.07⁵⁾ に匹敵する異常値で、これはカルボキシル基が2つのオルソヒドロキシル基とキレートすることによりアニオンが安定化し、そのため酸性が大になったと考えられることからこのカルボニルはカルボキシル基の隣に位置せねばならない。したがって呈色反応の結果をも考慮して部分構造 (X) が推定される。



ジヒドロ体の NMR における τ 5.23 の singlet 2H は $\text{=}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\underset{\text{H}}{\text{CH}_2}-\text{O}-$ 結合に由来する⁶⁾とすれば、この結合は黄色色素のピラン環の一部 $\text{>C=}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-$ が還元されたものと考えられる。したがって (X) との結びつきは (A)~(D) のいずれかである。

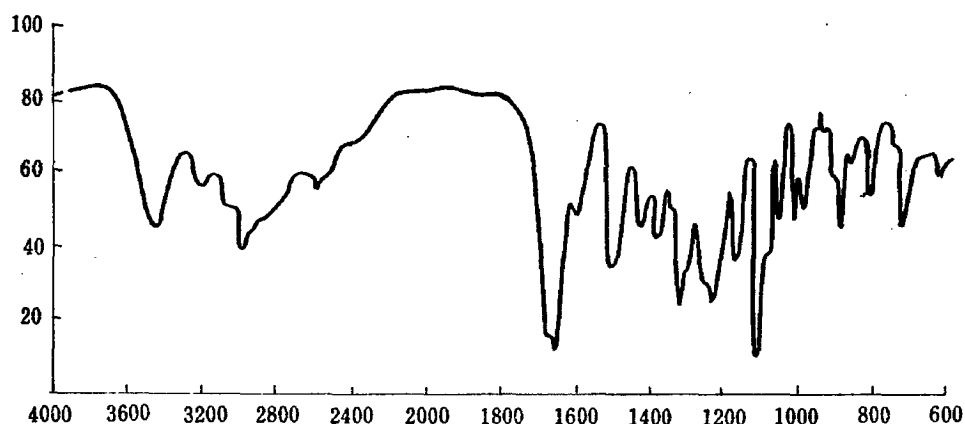


図 2 ジヒドロ体の赤外線吸収スペクトル (KBr 法)

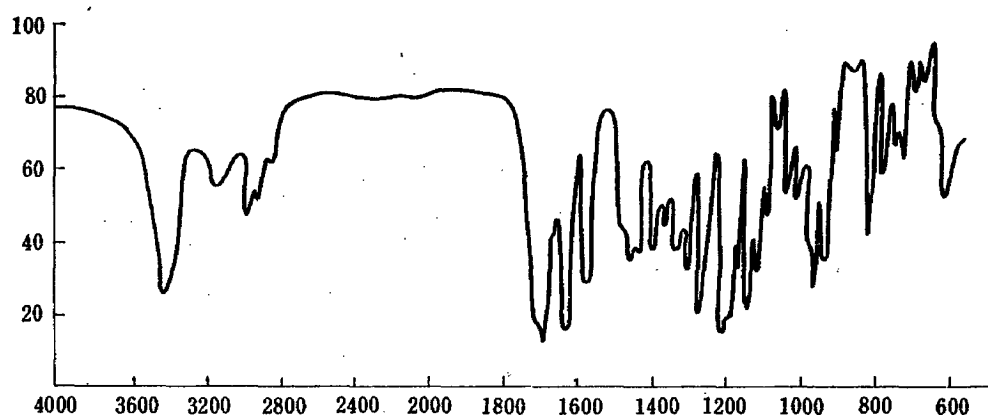
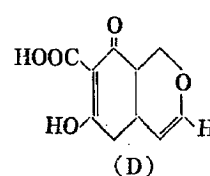
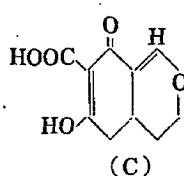
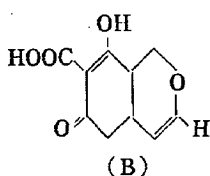
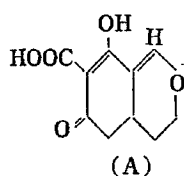


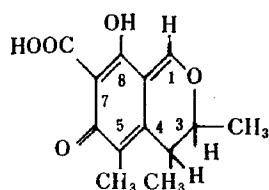
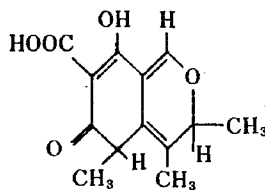
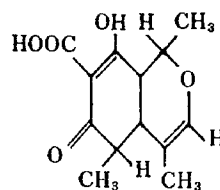
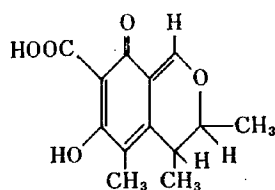
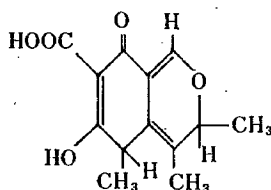
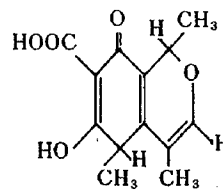
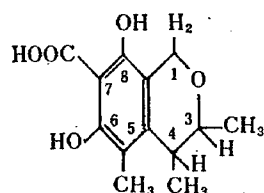
図 3 黄色結晶のメチルエステルの赤外線吸収スペクトル (KBr 法)



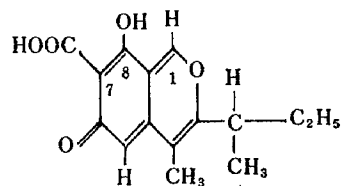
これら 4 式に 3 つのメチル基をそれぞれ結合させると (A₁)~(D₁) の 6 式が考えられるが、ジヒドロ体の構造を考慮すると (A₁) と (C₁) のみが還元によるジヒドロキン構造 (E) を可能にする。

(A₁) と同じ骨格を有する Ascochitine (F) の NMR は、7.8 位のカルボキシル基、水酸基が τ -5.5 と -5.9 に、1 位の水素が 1.1 に出ている⁷⁾。

平面式 (A₁) の物質は Raistrick ら⁸⁾ により *Penicillium citrinum* から単離された主としてグラム陽性菌に比較的弱い作用を示す抗菌性物質であるところのシトリニンにほかならない。

(A₁)(A₂)(B₁)(C₁)(C₂)(D₁)

(E)



(F)

ここにおいて *Penicillium citrinum* から得られた標品シトリニン (mp 163~165.5°C) と黄色結晶の混融試験を試みたが融点降下は認められず、また標品シトリニンの赤外吸収スペクトル (KBr 錠剤) は黄色結晶のそれと完全に一致した。この赤外吸収スペクトルは四塩化炭素溶液での測定⁹⁾と 1600~1500 cm⁻¹ 領域付近が大きく異なり臭化カリ錠剤法においては、1565 cm⁻¹ に幅広く強い特異吸収が認められ、この吸収は還元体 (図2) では消失し、黄色結晶のメチルエステル¹⁰⁾ (図3) では 1580 cm⁻¹ に鋭く認められることからカルボニルに由来し、しかもその吸収位置から共軛キレートカルボニルの吸収¹¹⁾であると考えられる。

黄色結晶の NMR は (表2) シトリニンの NMR¹²⁾ に一致するが、ジヒドロ体の NMR¹³⁾ は 3,4 位のメチル基の水素が doublet にならない。

ジヒドロ体のジアゾメタンによるエステル化物は、文献記載の¹⁰⁾ジヒドロシトリニンメチルエステルと同融点物質を与え、その IR スペクトルにもカルボキシル基を認めなかったが 3,5-ジニトロベンゾイル化においては1つの水酸基のみ反応にあずかった。恐らく立体障害によると思われるが6位の水酸基が反応しなかったのであろう。

なお G. Haese¹⁴⁾ は, *Penicillium expansum* から得られた新しい抗生物質の分子量が氷点法で 385 と出たためこれを $C_{21}H_{22}O_8$ の分子式を有する Antimycin と名付けたが沸点法では 248 もしくは 256 と出たので種々検討した結果, シトリニンであったと報告している。

最近シトリニンが, エンドウの成長を抑制し, その全窒素および蛋白態窒素を減少せしめるが非蛋白性窒素には影響を与えないという報告¹⁵⁾がある。

3. 実 験

3.1 黄色結晶の単離

皮むきジャガイモ 200 g, 蔗糖: グルコース=4:1 の糖 20 g, 水 1 l の割合で混ぜ, やわらかくなるまで煮てからフキンでこす。このロ液にペプトン 2.5 g を加え, 三角フラスコに分注し, 1.5 気圧, 15 分滅菌したのち菌を接種する。これを 28°C で約 2 週間培養すると, 菌体表面は黒緑色(孢子)だが白い裏側に黄色の部分を生じ培養液は黄色くなる。菌体をロ去, ロ液に 6 N 塩酸を加えて pH 2 に調節する。生ずる沈殿を 1 夜おいてからロカ, 乾燥する。6 l の培養液から粘膜炎性の黒味を帯びた黄色粉末が, 好条件下 5.3 g 得られる。この粉末 3.5 g に 44 ml のトルエンを加え, 30 分から 1 時間還流せしめて抽出し, 抽出液を温時ロカ, 冷却せしめると粗結晶 2.0 g が得られる。これをメタノールで再結晶して mp 165.5~167°C (dec.) の黄色板結晶を得た。 $\alpha_D^{27.5}$ -35.3° (c 0.56 in alc.)

分析値 C 62.53%, H 5.58%

$C_{13}H_{14}O_5$ としての計算値 C 62.39%, H 5.64%

$C_{21}H_{22}O_8$ としての計算値 C 62.68%, H 5.26%

3.2 黄色結晶の還元—ジヒドロシトリニン

黄色結晶 2.3 g (0.01 モル) を 70 ml のエタノールにとかし, これに新鮮なアダムスの酸化白金 165 mg を加え, 振盪しながら水素を通じ, 黄色が消失するまで接触還元する。触媒を除去してから溶媒を減圧下に留去し, 残滓に 10 ml のクロロホルムを加えてとかす。クロロホルム溶液をロカし, ロ液に石油エーテルを 12 ml 加える。この液を冷却して生ずる粗結晶 1.3 g をベンゼンで再結晶すると mp 158~159°C (dec.) の白色板状結晶が得られる。

分析値 C 62.02%, H 6.45%

$C_{13}H_{16}O_5$ としての計算値 C 61.89%, H 6.39%

$C_{21}H_{26}O_8$ としての計算値 C 62.06%, H 6.45%

3.3 ジヒドロ体のジアゾメタンによるエステル化

3.2 でつくられたジヒドロ体 230 mg を 4 ml の無水エーテルにとかし, これにジアゾメタンエーテル溶液 (0.2 g/6.6 ml) を滴下すると 2 ml 添加したとき窒素ガスの発生はやみ, 液は無色から黄色になった。反応液を 1 夜冷蔵したのち, 除々にエーテルを留去し, 無色液 1 ml を残

した。ついで減圧下に溶媒を留去せしめると無色の粘体が残る。これをベンゼン 2 ml にとかりて冷蔵する。10 日程で無色の結晶が器壁に付着する。mp 55~56°C¹⁰⁾ (石油エーテルから再結晶) アルコール溶液の塩化第二鉄試験は藍色であった。IR ν_{OH} 3415 cm⁻¹

3.2 ジヒドロ体の 3,5-ジニトロベンゾイル化

ジヒドに体 500 mg (0.002 モル弱) を 3,5-ジニトロベンゾイルクロリド 450 mg (0.002 モル弱) の 4 ml ベンゼン液に加え還流せしめる。50 分程で黄色の固形物が生ずる。なお 10 分還流せしめたのち反応液を室温に放置して冷却せしめ、ついで固形物を口取、乾燥せしめる。400 mg の粗結晶をベンゼンから再結晶して mp 173°C の濃黄色柱状結晶を得た。

分析値 C 51.92%, H 4.39%, N 6.20%

C₂₀H₁₈N₂O₁₀ としての計算値 C 51.55%, H 4.06%, N 6.27%

この報告を、このテーマの提案者であり、かつ滴定による分子量測定を行った、故山崎二葉理博に捧ぐ。

羊毛から単離した *Penicillium sp.* を提供下さった家政大学微生物学教室 神野節子農博、培養を行った山本研究室卒業生の石戸輝雄、鈴木捷一郎両君、標品シトリニンを分けて下さった国立衛生試験所倉田浩氏、NMR 測定の東京理科大学 田中克己氏、質量スペクトル測定の日立製作所那珂工場研究室以上の方々に深く感謝いたします。さらに自由な研究を援助下さった山本大二郎教授に感謝いたします。

なお本研究は昭和 41 年 (1966) 10 月日本化学会九州大会 (於 九州大学) において発表したものである。

文 献

- 1) F. Waygand und E. Csendes, Chem. Ber. 85, 45 (1952).
- 2) Elderfield, Heterocyclic Compounds I, 345 (1959). Wiley.
- 3) 山崎, 藤木, 村田, Bull. Chem. Soc. Japan 32, 8 (1965).
- 4) W. Baker, Nature 137, 236 (1936).
- 5) J. H. J. Dippy and S. R. C. Hughes, Tetrahedron 19, 1527 (1963).
- 6) 額田, 山本他, Anal. Chem. 35, 1894 (1963).
- 7) 岩井, 三島, 第 8 回天然有機化合物討論会講演要旨集 24 (1964).
- 8) H. Raistrick et al., Trans. Roy. Soc., 220 B, 269, 297 (1931).
- 9) a) Stefan Kovác et al., Nature 190, 1104 (1961).
b) V. Betina et al., Chemicke. Zvesti. 18, 128 (1964).
- 10) J. P. Brown et al., J. Chem. Soc., 1949, 867.
- 11) S. Forsen et al., Acta. Chem. Scand. 16, 583 (1962).
ibid 13, 1383 (1959).
- 12) D. W. Mathieson and W. B. Whally, J. Chem. Soc., 1964, 4640.
- 13) R. F. Curtis, C. H. Hassall and M. Nazar, J. Chem. Soc., 1968, C1 85.
- 14) G. Haese, Arch. Pharm., 296 (4), 227 (1963).
- 15) T. G. Mirchink et al., Mikrobiologiya 36 (5) 1036 (1967).